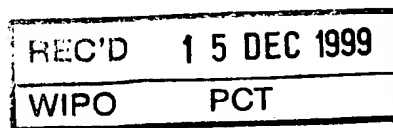


EDU

EP 93 / 7094



Bescheinigung

Herr Dr. Horst Lindhofer in Gröbenzell/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit
intakten Antikörpern zur Immunisierung"

am 21. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht
und erklärt, daß sie dafür die Innere Priorität der Anmeldung in der Bundesrepublik
Deutschland vom 25. September 1998, Aktenzeichen 198 44 157.6, in Anspruch
nimmt.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen
Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
A 61 K 39/395 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. November 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 59 115.2

Hoiß

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

DR. ERNST STURM (1951-1980)
DIPL.-CHEM. DR. HORST REINHARD
DIPL.-ING. UDO SKUHRA
DIPL.-ING. REINHARD WEISE
DIPL.-BIOL. DR. WERNER BEHNISCH
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER*
DIPL.-PHYS. DR. STEPHAN BARTH

FRIEDRICHSTR. 31
D-80801 MÜNCHEN
POSTF. / P.O. BOX 440151
D-80750 MÜNCHEN
* MOHRENSTR. 20
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P 10774
Dr.B/La

21. Dezember 1998

Anmelder : Dr. Horst Lindhofer
Bodenseestraße 12
82194 Gröbenzell

Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten Antikörpern zur Immunisierung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination mit intakten, bevorzugt heterologen Antikörpern zur Immunisierung von Mensch und Tier.

Die Immuntherapie durch Antikörper, insbesondere durch bispezifische oder trispezifische Antikörper, hat in den letzten Jahren an Bedeutung stetig zugenommen. Ein wesentliches Problem bei der Verwendung derartiger Antikörper in der Immuntherapie ist beispielsweise die Aktivierung der Immunzellen, z.B. der T-Lymphozyten.

In der DE 196 49 223 und der DE 197 10 495 sind intakte bispezifische und trispezifische Antikörper beschrieben, die zur

Die Tumorzellen und die Antikörper bilden erfindungsgemäß eine funktionelle Einheit und werden in Form einer Kombination verabreicht, um zielgerichtet eine Immunisierung zu erreichen, wobei es für den Erfolg der Verwendung darauf ankommt, daß ihre Anwendung zeitlich abgestuft voneinander erfolgt. Dabei ist es grundsätzlich möglich, zunächst die behandelten Tumorzellen zu verabreichen und, zeitlich abgesetzt hiervon, die Antikörper, oder zunächst die Antikörper an den Patienten zu verabreichen

und, zeitlich abgestuft hiervon, die Tumorzellen.

Der Zeitraum, der zwischen der Verabreichung der Tumorzellen und der Antikörper und vice versa liegt, beträgt bevorzugt ca. 1 - 48 Stunden. Besonders bevorzugt ist ein Zeitraum von 1 - 24 Stunden, weiterhin bevorzugt 1 - 12 Stunden. Weiterhin möglich sind Zeiträume von 1 - 6 Stunden oder 2 - 4 Stunden. Entscheidend für den Erfolg der vorliegenden Erfindung ist die zeitlich abgestufte Anwendung, wobei der anzuwendende Zeitraum auch von der Art des zu behandelnden Tumors und vom verwendeten Antikörper abhängen kann. Die jeweiligen optimalen Zeiträume können anhand von Versuchen vom Fachmann ermittelt werden.

Die verwendeten Tumorzellen sollen möglichst intakt verabreicht werden. Es ist jedoch auch notwendig, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird. Hierzu hat es sich als sinnvoll herausgestellt, die Tumorzellen entweder zu bestrahlen oder durch chemische Agentien am Überleben nach Reinfusion zu verhindern. Durch diese beiden Behandlungsarten bleibt insbesondere die äußere Struktur der Tumorzellen unverändert, d.h. das Erkennungsmuster für die Antikörper.

Zur Bestrahlung wird bevorzugt eine γ -Bestrahlung eingesetzt, die vorzugsweise mit einer Dosis von 20 - 200 Gy erfolgt. Bei einer chemischen Behandlung hat sich Mitomycin C besonders bewährt. Besonders bevorzugt werden heterologe bispezifische und/oder trispezifische Antikörper eingesetzt.

Der Immunisierungserfolg kann dadurch weiter verbessert werden, daß die Antikörper und die Tumorzellen, je zeitlich getrennt voneinander, mehrfach verabreicht werden. Eine weitere Verbesserung der Immunogenität der Tumorzellen ist dadurch erreichbar, daß diese vor Infusion einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden. Der bevorzugte Bereich liegt hier bei 41 - 42°C, wobei das Optimum durch Versuche ermittelt werden kann. Bevorzugte Ergebnisse werden bei einer Temperatur von ca. 41,8°C erzielt. Der Zeitraum für die Hitzevorbehandlung beträgt im allgemeinen

1 bis 6 Stunden, bevorzugt ca. 3 Stunden. Der Zeitraum als auch die Temperatur, die optimalerweise eingesetzt werden können, hängen von der Art des zu behandelnden Tumors ab. Die jeweiligen Optima können vom Fachmann anhand von Laborversuchen ermittelt werden.

Wie im syngen (autologen) murinen Tumormodell gezeigt werden konnte, spielen für eine besonders erfolgreiche Induktion der Immunität auch noch weitere Faktoren eine nicht unerhebliche Rolle. So ist die räumlich korrekte Präsentation des Tumormaterials wichtig. Die Tumorzellen müssen den für eine Immunisierung verantwortlichen Immunzellen im richtigen räumlichen Kontext präsentiert werden. Eine intravenöse (i.v.), intraperitoneale (i.p.) oder subkutane (s.c.) Applikation hat sich hierbei als besonders günstig herausgestellt, da hierdurch der optimale Kontakt in diesen Kompartimenten mit den entsprechenden Immunzellen unter Anwendung der bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper gewährleistet wird.

Zur erfolgreichen Immunisierung ist es weiterhin vorteilhaft, daß die Menge der verabreichten Tumorzellen in geeigneter Weise ausgewählt wird. So konnte in den Versuchen im murinen Tumormodell gezeigt werden, daß eine zu geringe Anzahl an Tumorzellen nicht den gewünschten Immunisierungserfolg bringt. Eine zu große Menge an Tumormaterial wiederum kann sich nachteilig auswirken, da beispielsweise Toleranzphänomene auftreten können. Überträgt man diese Resultate auf die Situation im Patienten, heißt dies, daß es für den Immunisierungserfolg vorteilhaft ist, eine definierte Menge an Tumormaterial im korrekten räumlichen Kontext mit einer ebenfalls definierten Menge an Antikörpern zu verabreichen. Ein Immunisierungserfolg stellt sich zwar auch dann ein, wenn einer dieser Parameter nicht optimiert wurde; besonders gute Ergebnisse werden jedoch erzielt, wenn sowohl die Mengen des Antikörpers als auch die Menge an Tumormaterial als auch der räumliche Kontext aufeinander abgestimmt und optimiert wurden.

Unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen kann bei einer zu geringen Tumorzellzahl beispielsweise nur ein unzureichender Immunschutz etabliert werden. Daher ist es für einen vollständigen Immunisierungserfolg notwendig, mit einer definierten Anzahl an aktivierten Tumorzellen und einer definierten Menge an bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern zu immunisieren. Die jeweiligen Zahlen können vom Fachmann anhand von Versuchen etabliert werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper werden bevorzugt in einer Menge von 5 - 500 µg, weiterhin bevorzugt 10 - 300 µg, 10 - 100 µg oder 10 - 50 µg, je pro Infusion, verabreicht. Die Menge des eingesetzten Antikörpers hängt von der Art des zu behandelnden Tumors, von der Reaktion des Patienten und weiteren Faktoren ab. Die optimalen Mengen können vom Fachmann anhand von Versuchen ermittelt werden.

Die Tumorzellen werden bevorzugt in einer Menge von 10^7 - 10^9 Zellen pro Infusion verabreicht, wobei sich eine Zellzahl von ca. 10^8 als bevorzugt herausgestellt hat. Die Tumorzellen wurden, wie oben ausgeführt, vor der Reinfusion so behandelt, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, wobei sie wahlweise zusätzlich einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden können. Nähere Ausführungen hierzu sind in der vorliegenden Beschreibung enthalten.

Unumgänglich ist jedoch die zeitlich versetzte Verabreichung der Tumorzellen und der Antikörper. Dadurch wird gewährleistet, daß durch die Injektion des bispezifischen und/oder trispezifischen, bevorzugt heterologen Antikörpers in den zu behandelnden Tieren oder Menschen zunächst aufgrund des Überschusses an vorhandenen T-Lymphozyten im peripheren Blut diese über den hochaffinen Bindungsarm gebunden und präaktiviert werden. Zusätzlich können auch vorhandene Fc-Rezeptor positive akzessorische Immunzellen über den Fc-Anteil des bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers gebunden werden. Wird nun dieser

Zellkomplex aus T-Zelle und Fc-Rezeptor positiver Zelle über den zweiten hochaffinen Tumorbindingarm an die vergleichsweise in geringer Anzahl vorhandenen Tumorzellen herangeführt, werden diese durch T-Lymphozyten bzw. Fc-Rezeptor positiven Zellen zerstört und über die in den Zellkomplex eingebundenen Fc-Rezeptor positiven Zellen, beispielsweise Makrophagen, phagozytiert. Dies konnte in einem Versuch mit markierten humanen Monozyten/Makrophagen und Tumorzellen bereits gezeigt werden. In einem nächsten Schritt wird das aufgenommene Tumormaterial prozessiert und über MHC Klasse I und insbesondere Klasse II Moleküle dem Immunsystem präsentiert, was eine wichtige Voraussetzung für die beobachtete humorale Immunantwort darstellt.

Wie das erfindungsgemäße Beispiel zeigt, setzt der Nachweis von tumorreaktiven Antikörpern, die nach einer Therapie gebildet wurden, die Aktivierung von CD4+ tumorspezifischen T-Lymphozyten voraus, die über die T-B-Zell-Kooperation tumorspezifische B-Zellklone stimulieren können. Durch den Nachweis der humoralen Immunantwort konnte somit indirekt ebenfalls eine zelluläre CD4-T-Zellantwort nachgewiesen werden und somit das Überleben der Mäuse als Folge der erfindungsgemäßen zeitlich versetzten Gabe von Tumorzellen und Antikörpern erklärt werden.

BEISPIEL

In einem murinen, autologen Tumormodell wurde der Aufbau eines langanhaltenden Immunschutzes gegen den Tumor mit Hilfe von bsAk untersucht. Hierzu wurde C57BL/6 Mäusen zunächst eine an sich letale Dosis an autologen Melanomzellen verabreicht und zwei Tage später parentale bzw. bispezifische Antikörper nachinjiziert. Um zu testen, ob in den Mäusen hierbei ein langanhaltender Immunschutz aufgebaut worden ist, wurden die überlebenden Mäuse nach 100 Tagen einer erneuten Tumorgabe, diesmal jedoch ohne Ak, unterzogen. Um ferner der Frage nachzugehen, inwieweit für die Entwicklung des Immunschutzes die Anzahl an

verabreichten Tumorzellen eine Rolle spielt, wurden die Versuche mit einer niedrigen Tumordosis von 1500 Tumorzellen (TZ) sowie mit einer hohen Dosis von 5000 Tumorzellen durchgeführt. Neben dem Überleben der Mäuse wurde darüber hinaus eine vorhandene humorale Immunantwort gegen den Tumor als Kriterium für einen vorliegenden Immunschutz herangezogen. Hierzu wurden die Seren der Mäuse vor und 100 Tage nach der Behandlung (unmittelbar vor der erneuten Tumorgabe) auf das Vorhandensein von anti-Tumorantikörpern miteinander verglichen.

Die Abbildung 1 zeigt die Überlebenskurven der Mäuse nach der primären Tumorgabe von 1500 bzw. 5000 Tumorzellen. Während die Kontrollmäuse ohne Antikörper-Behandlung alle innerhalb von 35 Tagen verstarben, konnten sämtliche mit bsAk behandelten Mäuse geheilt werden. Im Vergleich hierzu überlebten von den Mäusen, die mit einer Kombination aus den beiden parentalen Ak behandelt wurden, nur 84% nach der niedrigen Tumordosis und nur 16% nach der hohen Tumordosis.

Dieser qualitative Unterschied zwischen den bsAk und den parentalen Ak machte sich auch bei der Ausbildung einer humoralen Immunantwort bemerkbar. Die Abbildung 2 zeigt die in der Durchflußzytometrie gemessene humorale Immunantwort gegen die Tumorzellen. Während die Überlebenden aus der "parentalen Gruppe" keine humorale Immunantwort aufwiesen, zeigte sich dies bei den Mäusen aus der "bisppezifischen Gruppe". Besonders wichtig hierfür war allerdings die Menge an verabreichtem Tumormaterial. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit niedrig- und hochdosierter Tumorgabe. Während nach niedriger verabreichter Tumordosis nur 17% der Mäuse einen starken und 33% einen schwachen Titer aufwiesen, konnte nach der höheren Tumordosis bei 66% der Mäuse ein starker Titer nachgewiesen werden.

~~Des weiteren korrelieren die gewonnenen Daten zur humoralen~~
Immunantwort eindeutig mit dem Überleben der Mäuse nach erneuter Tumorgabe ohne nachfolgende Antikörper-Injektion. Nur die

Mäuse, die einen starken Antikörper-Titer gegen den Tumor aufgebaut hatten, überlebten die Tumorgabe oder starben stark verzögert im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Immunisierung. Hingegen starben alle Mäuse ohne nachweisbaren Titer zuerst und ohne Verzögerung im Vergleich zur Kontrolle. In Abbildung 3

sind die Überlebenskurven der Mäuse dargestellt, die einer erneuten Tumorgabe unterzogen wurden ohne diese Mäuse anschließend wieder mit Antikörper zu behandeln. Die Mäuse, die eine hohe Primärgabe von 5000 TZ erhalten hatten, besaßen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den Mäusen mit einer niedrig dosierten Primärtumorgabe von 1500 TZ.

Nachfolgend werden bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung, insbesondere in Bezug auf die zu verwendenden bispezifischen und trispezifischen Antikörper und die Tumorzellen, offenbart.

Die Tumorzellen werden aus einem Patienten entnommen (autologe Tumorzellen). Um ein Überleben der Tumorzellen nach Reinfusion zu verhindern, werden sie vor dem Inkontaktbringen mit den Antikörpern, was ja erfindungsgemäß erst im Körper erfolgt, in an sich bekannter Weise behandelt, beispielsweise durch Bestrahlung. Erfindungsgemäß sind nicht beliebige Antikörper verwendbar, sondern diese müssen intakt sein, d.h. sie müssen einen funktionellen Fc-Teil besitzen. Bevorzugt sind sie heterologer Natur, d.h. die Antikörper sind aus schweren Immunglobulinketten unterschiedlicher Subklassen (-Kombinationen, auch Fragmente) und/oder Herkunft (Spezies) zusammengesetzt.

Diese intakten heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie weiterhin die nachfolgenden Eigenschaften aufweisen:

- α - Binden an eine T-Zelle;
- β - Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
- γ - Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Antikörper sind befähigt, die Fc-Rezeptor positive Zelle zu aktivieren, wodurch die Expression von Zytokinen und/oder kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.

Bei den trispezifischen Antikörpern erfolgt die Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen bevorzugt beispielsweise über den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen oder auch über andere Antigene auf Fc-Rezeptor positiven Zellen (Antigen-präsentierenden Zellen), wie z.B. den Mannose-Rezeptor.

Durch die erfindungsgemäße, zeitlich abgestufte Anwendung der intakten, bevorzugt heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper wird im Patienten eine Tumormunität aufgebaut, bevorzugt eine Langzeit-Tumormunität. Die Verabreichung (Reinfusion) erfolgt bevorzugt in einem Patienten nach der Behandlung des Primärtumors, bevorzugt bei Patienten in einer minimal residual disease (MRD)-Situation. Bei Patienten mit wenig verbliebenen Tumorzellen, bei denen allerdings die Gefahr eines Rezidivs hoch sein kann, ist die erfindungsgemäß beschriebene zeitlich abgestufte Anwendung besonders erfolgreich.

Die erfindungsgemäß verwendbaren heterologen bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörper sind zum Teil an sich bekannt, zum Teil werden sie aber auch in der vorstehenden Anmeldung zum ersten Mal beschrieben. Ein Beispiel für einen bsAk ist der Antikörper anti-CD3 X anti-EpCAM (GA-733-2) der bei epithelialen Tumoren wie dem Mammacarcinom eingesetzt wird.

Auf der Tumorzelle erfolgt eine Hochregulation von MHC 1, sowie eine Aktivierung der intrazellulären Prozessierungsmaschinerie (Proteasom-Komplex) aufgrund der Freisetzung von Zytokinen (wie z.B. INF- γ und TNF- α) in unmittelbarer Nachbarschaft der Tumorzelle. Die Zytokine werden aufgrund bispezifischer Antikörper-vermittelter Aktivierung von T-Zellen und akzessorischen Zellen freigesetzt. D.h. durch den intakten bsAk werden nicht nur Tu-

morzellen zerstört oder phagozytiert, sondern indirekt auch deren Tumorimmunogenität erhöht.

Die Aktivierung der Fc-Rezeptor positiven Zelle durch den bsAk ist von der Subklasse bzw. der Subklassenkombination des bsAk abhängig. Wie in in vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnte, sind beispielsweise bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG2a/-Ratte-IgG2b in der Lage, an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden und diese gleichzeitig zu aktivieren, was zur Hochregulation bzw. Neuausbildung (Expression) von kostimulatorischen Antigenen, wie z.B. CD40, CD80 oder CD86, auf der Zelloberfläche dieser Zellen führt. Dagegen sind bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG1/IgG2b zwar in der Lage an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden (1) Haagen et al., J. Immunology, 1995, 154: 1852-1860, können diese aber offenbar nicht in vergleichbarem Maße aktivieren (2) Gast et al., Cancer Immunol. Immunotherap., 1995, 40: 390.

Während der intakte bsAk die T-Zelle mit einem Bindungsarm (z.B. an CD3 oder CD2) bindet und gleichzeitig aktiviert, können kostimulatorische Signale von der an den Fc-Teil des bsAk gebundenen Fc-Rezeptor positiven Zelle an die T-Zelle übermittelt werden. D.h. erst die Kombination von Aktivierung der T-Zelle über einen Bindungsarm des bsAk und der gleichzeitigen Übertragung von kostimulatorischen Signalen von der Fc-Rezeptor positiven Zelle auf die T-Zelle, führt zu einer effizienten T-Zellaktivierung (Abb. 4A). Tumor-spezifische T-Zellen, die an der Tumorzelle ungenügend aktiviert wurden und anergisch sind, können nach der erfindungsgemäßen ex vivo-Vorbehandlung ebenfalls reaktiviert werden (Abb. 4B).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Induktion einer Tumorimmunität ist die mögliche Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Tumorbestandteilen durch die vom bsAk herangeführten und aktivierten akzessorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, oder dendritische Zellen). Durch diesen klassischen Mechanismus der Präsentation von Antigenen können sowohl tumorspezifische

Für den letzten Punkt gibt es erste in vivo-Daten aus Mausversuchen, die auf eine derartige dauerhafte Tumormunität nach

Behandlung mit einem syngenem Tumor und intakten bsAk hinweisen. In diesen Versuchen überlebten insgesamt 14 von 14 Tieren, die nach einer ersten Tumoringjektion erfolgreich mit bsAk behandelt werden konnten, eine weitere Tumoringjektion 144 Tage nach der ersten Tumoringjektion - ohne eine erneute Gabe von bsAk.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind bevorzugt zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, tumorspezifischen T-Zellen befähigt. Weiterhin sind sie zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort in der Lage.

Die Bindung erfolgt bevorzugt über CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zelle. Die Fc-Rezeptor positiven Zellen weisen zumindest einen Fc γ -Rezeptor I, II oder III auf.

Erfindungsgemäß einsetzbare Antikörper sind zur Bindung an Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen) und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fc γ -Rezeptor 1 und/oder III positive Zellen befähigt.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper bewirken, daß die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene oder/und die Sekretion von Zytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird. Die Zytokine sind bevorzugt IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, INF- γ und/oder TNF- α .

Die Bindung an die T-Zelle erfolgt bevorzugt über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen Antikörper sind beispielsweise:

- ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder

anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper sind bevorzugt:

- ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren trispezifischen Antikörper weisen zumindest eine T-Zell-Bindungsarm, einen Tumorzell-Bindungsarm und einen an Fc-Rezeptor positive Zellen bindenden Bindungsarm auf. Dieser zuletzt genannte Bindungsarm kann ein anti-Fc-Rezeptor-Bindungsarm oder ein Mannose-Rezeptor-Bindungsarm sein.

Der bispezifische Antikörper ist bevorzugt ein heterologer intakter Ratte/Maus bispezifischer Antikörper.

Mit den erfindungsgemäß einsetzbaren bispezifischen und trispezifischen Antikörpern werden T-Zellen aktiviert und gegen die Tumorzellen redirigiert. Bevorzugt einsetzbare heterologe intakte bispezifische Antikörper werden aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotyp-Kombinationen ausgewählt:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,

Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit * gekennzeichnet]

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-
Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3,

orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale

Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*-[CH3]

Bei den erfindungsgemäß verwendbaren Antikörpern handelt es sich vorzugsweise um monoklonale, chimäre, rekombinante, synthetische, halbsynthetische oder chemisch modifizierte intakte Antikörper mit beispielsweise Fv-, Fab-, scFv- oder F(ab)₂-Fragmenten.

Bevorzugt werden Antikörper oder Derivate oder Fragmente vom Menschen verwendet oder solche, die derart verändert sind, daß sie sich für die Anwendung beim Menschen eignen (sogenannte "humanized antibodies") (siehe z.B. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57 (1994), 405).

Die Herstellung der verschiedenen oben genannten Antikörpertypen

pen und -fragmente ist dem Fachmann geläufig. Die Herstellung monoklonaler Antikörper, die ihren Ursprung vorzugsweise in Säugetieren, z.B. Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen oder Ziege, haben, kann mittels herkömmlicher Methoden erfolgen, wie sie z.B. in Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow und Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) oder in Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3) oder der DE 195 31 346 beschrieben sind.

Ferner ist es möglich, die beschriebenen Antikörper mittels rekombinanter DNA-Technologie nach dem Fachmann geläufigen Techniken herzustellen (siehe Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sc. USA 90 (1993), 6444).

Die Herstellung von Antikörpern mit zwei verschiedenen Spezifitäten, den sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist zum einen durch Anwendung rekombinanter DNA-Technologie möglich, aber auch durch die sogenannte Hybrid-Hybridoma-Fusionstechnik (siehe z.B. Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Hierbei werden Hybridomazelllinien, die Antikörper mit jeweils einer der gewünschten Spezifitäten produzieren, fusioniert und rekombinante Zelllinien identifiziert und isoliert, die Antikörper mit beiden Spezifitäten produzieren.

Das der Erfindung zugrunde liegende Problem kann sowohl durch bispezifische als auch trispezifische Antikörper gelöst werden, sofern sie die im Anspruch 1 gekennzeichneten Eigenschaften und Wirkungen aufweisen. Nachfolgend wird die Herstellung von Antikörpern mit Zwei- und Dreispezifitäten näher beschrieben. Die Bereitstellung derartiger bispezifischer und trispezifischer Antikörper gehört zum Stand der Technik, und auf die derartige Herstellungstechniken beschreibende Literatur wird hier voll inhaltlich Bezug genommen.

Die Herstellung von Antikörpern mit drei Spezifitäten, sogenannten trispezifischen Antikörpern, durch die das der Erfin-

zung zugrundeliegende Problem ebenfalls lösbar ist, kann beispielsweise derart erfolgen, daß an eine der schweren Ig-Ketten eines bispezifischen Antikörpers eine dritte Antigenbindungsstelle mit einer weiteren Spezifität, z.B. in Form eines "single chain variable fragments" (scFv), angekoppelt wird. Das scFv kann beispielsweise über einen

-S-S(G₄S)_nD-I-Linker

an eine der schweren Ketten gebunden sein (S = Serin, G = Glycin, D = Aspartat, I = Isoleucin).

Analog dazu können trispezifische F(ab)₂-Konstrukte hergestellt werden, indem die CH₂-CH₃-Regionen der schweren Kette einer Spezifität eines bispezifischen Antikörpers ersetzt werden durch ein scFv mit einer dritten Spezifität, während die CH₂-CH₃-Regionen der schweren Kette der anderen Spezifität beispielsweise durch Einbau eines Stopcodons (am Ende der "Hinge"-Region) in das codierende Gen, z.B. mittels homologer Rekombination, entfernt werden (siehe Abb.5).

Möglich ist auch die Herstellung trispezifischer scFv-Konstrukte. Hierbei werden drei VH-VL-Regionen, die drei verschiedene Spezifitäten repräsentieren, hintereinander in Reihe angeordnet (Abb.6).

Erfindungsgemäß werden z.B. intakte bispezifische Antikörper verwendet. Intakte bispezifische Antikörper sind aus zwei Antikörper-Halbmolekülen (je eine H- und L-Immunglobulinkette), die jeweils eine Spezifität repräsentieren, zusammengesetzt, und besitzen darüber hinaus, wie normale Antikörper auch, einen Fc-Teil mit den bekannten Effektorfunktionen. Sie werden bevorzugt durch die Quadrom-Technologie hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren ist beispielhaft in der DE-A-44 19 399 beschrieben. Auf diese Druckschrift, auch bzgl. einer Definition der bispezifischen Antikörper, wird zur vollständigen Offenbarung vollinhaltlich Bezug genommen. Selbstverständlich sind auch andere Herstellungsverfahren einsetzbar, solange sie zu den erfindungsgemäß notwendigen intakten bispezifischen Antikörpern der

obigen Definition führen.

Beispielsweise können in einem neu entwickelten Herstellungsverfahren (6) intakte bispezifische Antikörper in ausreichender Menge produziert werden. Die Kombination von 2 bispezifischen Antikörpern gegen 2 unterschiedliche tumorassoziierte Antigene (z.B. c-erb-B2, ep-cam, beispielsweise GA-733-2 = C215) auf den Mammakarzinomzellen minimiert die Gefahr, daß Tumorzellen, die nur ein Antigen exprimieren, unerkant bleiben.

Es wurde auch versucht, durch Behandlung mit bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten mit den Spezifitäten anti-c-erb-B2 x antiCD64 eine Tumormunität zu erreichen. Der Hauptnachteil von bsF(ab')₂-Fragmenten liegt darin, daß aufgrund der verwendeten Spezifitäten lediglich FcγRI⁺ Zellen an den Tumor redirigiert werden. T-Zellen werden durch diesen bispezifischen Antikörper nicht an den Tumor redirigiert. Die FcγRI⁺ Zellen können zwar indirekt durch Präsentation von tumorspezifischen Peptiden (über MHC I bzw. MHCII) nach z.B. Phagozytose von Tumorzellbestandteilen tumorspezifische T-Zellen aktivieren, die Effizienz der Induktion einer Tumormunität ist hier aber niedriger, da T-Zellen durch diesen bsAK nicht gebunden werden und auch nicht zur Kostimulation der Fc-Rezeptor positiven Zellen beitragen können.

Weitere Vorteile von intakten bsAk mit der Fähigkeit zur Redirektion von T-Zellen gegenüber den o.g. bsF(ab')₂ Fragmenten sind im einzelnen:

1. An intakte bsAk können Fc-Rezeptor positive Zellen binden und einerseits über ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) direkt zur Tumorerstörung beitragen sowie andererseits wie oben näher ausgeführt zur T-Zellaktivierung.
2. Durch intakte T-Zell-redirigierende bsAk werden auch anergisierte tumorspezifische T-Zellen an die Tumorzelle her-

angeführt, die erfindungsgemäß direkt am Tumor reaktiviert werden können. Dies kann durch ein bsF(ab')₂-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziertes Antigen nicht erreicht werden.

3. Ein bsF(ab')₂-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziertes Antigen kann lediglich eine Tumormunität in 30% der Patienten erzielen, während erfindungsgemäß in Mausversuchen mit T-Zell-redirigierenden intakten bsAk ein Schutz in 100% der Tiere erzielt werden konnte.

Die Bindung des bsAk an Fcγ-RI besitzt zwei wesentliche Vorteile im Hinblick auf eine optimale anti-Tumorwirksamkeit:

- (1) Fcγ-RI positive Zellen besitzen die Fähigkeit mittels ADCC Tumorzellen zu eliminieren und können insofern synergistisch zur anti-Tumorstörung der durch den bsAk an die Tumorzelle herangeführten cytotoxischen T-Zellen beitragen.
- (2) Fcγ-RI positive Zellen (wie z.B. Monozyten/Makrophagen/-Dendriten) sind in der Lage, wichtige kostimulatorische Signale, ähnlich wie bei der Antigen-Präsentation, der T-Zelle zu liefern und damit eine Anergisierung der T-Zelle zu verhindern. Wie in Abbildung 4 gezeigt können weiterhin, als erwünschtes Nebenprodukt, aufgrund der durch intakten bsAk vermittelten Interaktion von T-Zelle mit akzessorischer Zelle und Tumorzelle sogar T-Zellen, deren T-Zellrezeptor tumorspezifische Peptide (über MHC Antigene auf der Tumorzelle präsentiert) erkennt, stimuliert werden. Die für eine korrekte Aktivierung der T-Zelle notwendigen Kostimuli würden in dieser Konstellation von der akzessorischen Zelle (z.B. Monocyt) geliefert werden. Insofern sollte der erfindungsgemäße Antikörper neben der direkten T-Zellrezeptor-unabhängigen, durch bsAk vermittelten Tumorerstörung (Abb.4A) ebenfalls tumorspezifische T-Zellen aktivieren und generieren (Abb.4B), die nach Ab-

bau der bsAk weiterhin im Patienten patrouillieren. D.h. mittels intakter bsAk kann ähnlich wie bei gentherapeutischen Ansätzen (z.B. durch Einbau von kostimulatorischen Antigenen wie B-7 in die Tumorzelle) die Tumortoleranz im Patienten durchbrochen werden.

Günstig in diesem Zusammenhang ist weiterhin, daß die Expression von Fcγ-RI nach G-CSF -Behandlung auf den entsprechenden Zellen hochreguliert wird.

Die erfindungsgemäß eingesetzten intakten, bevorzugt herterologen spezifischen und/oder trispezifischen Antikörper weisen in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die nachfolgenden Eigenschaften auf:

- a) Binden an eine T-Zelle;
- b) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Zielzelle;
- c) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positive Zellen

und sie induzieren hierdurch eine Immunantwort und/oder zerstörte Zielzellen, wobei der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle nicht ausreicht. (Abb. 7A + B)

Es konnte gezeigt werden, daß nach Induktion bereits eine relativ geringe Anzahl der Zielantigene auf der Zielzelle ausreichend ist, um die intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper zu binden und eine Zerstörung der Zielzelle und/oder eine Immunantwort einzuleiten. Unter "geringe Anzahl" wird erfindungsgemäß eine Anzahl von Zielantigenen auf der Zielzelle von mehr als 100 Zielantigenen pro Zielzelle, bevorzugt mehr als 300 und weiterhin bevorzugt mehr als 1000 Zielantigenen pro

Zelle verstanden. Die induzierbaren Zielantigene können auch in einer Menge von bis zu 500.000 pro Zielzelle vorliegen, wobei auch Mengen bis zu 400.000, bis zu 300.000, bis zu 200.000 oder bis zu 100.000 pro Zielzelle induzierbar sind. Ein weiterer bevorzugter Mengenbereich, in dem die Zielantigene vorliegen können, ist von 50.000 bis 100.000 und von 5000 bis 50.000.

Beispiele für induzierbare Oberflächenantigene auf Zielzellen (Zielantigene), die für eine Immuntherapie durch intakte bispezifische und trispezifische Antikörper einsetzbar sind, sind Hitzeschock-Proteine und "MHC-Klasse I-verwandte" MIC-Moleküle. Hitzeschock-Proteine (Hsp) werden von der Zelle als Antwort auf Zellstreß synthetisiert. Unter "Zellstreß" ist erfindungsgemäß beispielsweise eine Entartung der Zelle, das Einwirken von Strahlen, chemischen Substanzen und von erhöhter Temperatur auf die Zelle sowie die Infektion der Zelle durch Mikroorganismen zu subsumieren. Zur Zeit sind vier Familien von Hitzeschock-Proteinen bekannt, die aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts differenziert werden. Diese Familien werden als Hsp25, Hsp60, Hsp70 und Hsp90 bezeichnet, wobei die Zahl das ungefähre Molekulargewicht der Streßproteine in Kilo-Dalton wiedergibt. Die Hitzeschock-Proteine zeichnen sich durch hochkonservierte Aminosäuresequenzen aus, wobei der Grad der Konservierung bei über 35 % Aminosäure-Identität, bevorzugt bei 35 - 55 %, weiterhin bevorzugt 55 - 75% und am bevorzugtesten zwischen 75 % bis 85 % Aminosäure-Identität liegt.

Auf folgende Übersichtsartikel wird verwiesen: Annu. Rev. Genet. 27, 437-496 (1993); Biochimie 76, 737-747 (1994); Cell. Mol. Life Sci. 53, 80-129, 168-211 (1997); Experientia 48, 621-656 (1992); Kabakov u. Gabai, Heat Shock Proteins and Cytoprotection, Berlin: Springer 1997.

Hitzeschock-Proteine werden im Normalfall auf gesundem Gewebe nicht exprimiert. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, daß Hitzeschock-Proteine beispielsweise auf Tumorzelllinien und auf Tumormaterial aus Patienten exprimiert werden können (Mel-

cher et al., Nature Medicine, 4:581, 1998). Die Expression der Hitzeschock-Proteine auf den Tumorzelllinien ist aber relativ schwach und deshalb für bisher bekannte immuntherapeutische Ansätze mit monoklonalen Antikörpern und unvollständigen (F(ab)2) bispezifischen Antikörpern ungeeignet.

Beispiele für Hitzeschock-Proteine sind Hsp60 und Hsp70/72.

Gleiches gilt für MIC-Moleküle. Auch diese Moleküle sind durch Zellstreß, wie oben näher definiert, induzierbar. MIC-Moleküle sind MHC I-verwandte Moleküle, die unter Kontrolle von Hitzeschock-Promoter-Elementen stehen (Groh et al., PNAS 93: 12445, 1996). Beispiele für MIC-Moleküle sind MIC A und MIC B. Auch für MIC-Moleküle konnte gezeigt werden, daß sie auf Normalgewebe nicht oder nur in so geringer Menge exprimiert werden, daß sie als Zielstruktur zur Erkennung durch einen Antikörper, um eine Zerstörung der Zielzelle zu erreichen, nicht geeignet sind, während sie auf beispielsweise epithelialen Tumoren in einer solchen Menge exprimiert werden, daß sie durch die erfindungsgemäß bereitgestellten bispezifischen und trispezifischen Antikörper bei einer Immuntherapie als Zielantigene einsetzbar sind.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörper werden so ausgewählt, daß sie gegen zumindest ein Zielantigen auf einer Zielzelle gerichtet sind, welches induzierbar ist und auf der Zielzelle im nicht induzierten Zustand nicht oder im wesentlichen nicht vorkommt. Diese Zahl liegt beispielsweise bei ca. 100 Zielantigenen/Zelle. Dies heißt jedoch nicht, daß derartige Zielantigene auf anderen Zellen, d.h. Nicht-Zielzellen, nicht vorkommen können. Beispielsweise kommen auf sich schnell regenerierendem Gewebe, z.B. den Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes, auch im physiologischen Zustand, konstitutiv exprimiert, Hitzeschockproteine vor. Diese Hitzeschockproteine werden jedoch von der vorliegenden Erfindung nicht mit umfaßt, da sie nicht induzierbar

sind, sondern bereits auf Normalgewebe vorkommen. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper, die gegen Hitzeschockproteine gerichtet sind, können auch bestimmte Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes zerstört werden, da diese, wie oben ausgeführt, konstitutiv Hitzeschockproteine auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die mögliche Zerstörung dieser Zellen ist für einen Patienten zwar mit gewissen Nachteilen verbunden, die jedoch im Vergleich zur erzielbaren Tumorzerstörung gering anzusetzen sind.

Das sich schnell regenerierende Gewebe ist somit nicht primäres Target der erfindungsgemäßen Antikörper, kann jedoch dann von den Antikörpern "getroffen" werden, wenn der erfindungsgemäße Antikörper nicht nur die induzierbaren Zielantigene auf der Zielzelle erkennt, sondern diese Antigene z.B. auch auf sich schnell regenerierendem Gewebe vorkommen. Da sich dieses Gewebe jedoch schnell teilt, kann nach Absetzen der Antikörper-Therapie der ursprüngliche Zustand dieses Gewebes relativ rasch so wieder hergestellt werden, daß es seine physiologische Aufgabe wieder erfüllen kann. Die Erfindung ist also nicht darauf gerichtet, daß die erfindungsgemäßen bispezifischen und trispezifischen Antikörper Antigene auf z.B. sich schnell regenerierendem Gewebe erkennen, welche dort unter Umständen konstitutiv exprimiert werden, sondern die Erfindung umfaßt ausschließlich solche Antikörper, die gegen Zielantigene gerichtet sind, die auf der Zielzelle induzierbar sind und nach Induktion, beispielsweise auch konstitutiv, exprimierbar sind.

Erfindungsgemäß werden unter "induzierbar" solche Zielantigene verstanden, die hier operationell tumorspezifisch sind und im physiologischen Zustand auf der Zelle nicht oder nur in einer solchen Anzahl vorkommen, daß eine Immunantwort gegen sie nicht induzierbar ist oder eine Zerstörung der Zielzellen aufgrund dieser geringen Anzahl nicht oder in einem nicht wesentlichen, therapeutisch nutzbaren Umfang stattfindet.

Als induzierbare Zielantigene auf einer Zielzelle sind nicht

nur solche auf einer Tumorzelle zu verstehen, sondern auch Antigene, die induziert werden, wenn die Zielzelle beispielsweise durch einen Mikroorganismus infiziert wird. Unter "Mikroorganismus" wird erfindungsgemäß jeder Organismus verstanden, der die Zielzelle so beeinflusst, daß auf seiner Oberfläche ein vom Mikroorganismus induziertes Zielantigen im oben beschriebenen Umfang exprimiert wird. Unter Mikroorganismen werden erfindungsgemäß beispielsweise Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze verstanden. Zu den Bakterien gehören beispielsweise Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mycoplasmen und Rickettsien. Von den Protozoen mitumfaßt werden insbesondere Plasmodien. Von den Viren umfaßt werden beispielsweise Retroviren, Adenoviren, Herpesviren, Hepatitis-Viren, Togaviren, Pockenviren usw. Entscheidend ist, daß in Zellen, die von einem oder mehreren dieser Mikroorganismen infiziert wurden, auf der Zelloberfläche Antigene exprimiert werden, die durch die Mikroorganismen-Infektion induziert werden. Dabei handelt es sich um Antigene, die von den Zielzellen als Antwort auf die Mikroorganismen-Infektion produziert werden und auf der Zelloberfläche erscheinen (wirtseigene Antigene), nicht dagegen um Zielantigene, die durch die Mikroorganismen selbst produziert werden. Die Infektion einer Zielzelle durch einen Mikroorganismus führt ebenfalls zu einer Zellstreß-Situation für die Zelle, die als Antwort hierauf die Expression bestimmter Proteine induziert, beispielsweise von Hitzeschock-Proteinen und von MIC-Proteinen.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten intakten bispezifischen und trispezifischen Antikörper führen nicht nur einen Typ von Immunzellen, sondern T-Zellen und akzessorische Zellen an die Zielzelle heran, und sie sind aus diesem Grund für die Erkennung induzierbarer Oberflächenantigene als operationelle Zielstrukturen besonders geeignet. Es konnte gezeigt werden, daß bereits wenige Zielantigene in einer Menge von 100 bis 5000 pro Zelle auf der Zielzelle ausreichend sind, um diese zu zerstören. Die hierzu durchgeführten in vitro-Experimente mit Stammzellpräparaten (PBSZ) sind im nachfolgenden Beispiel A beschrieben. Somit ist die erfindungsgemäße Klasse intakter bi-

spezifischer und trispezifischer Antikörper befähigt, auch bei einer sehr geringen Expression der Zielantigene Tumorzellen oder Zielzellen zu zerstören oder nach deren Erkennung eine Immunantwort zu initiieren.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können, da sie gegen induzierbare Antigene gerichtet sind, dazu beitragen, das Problem fehlender zielzellspezifischer, für eine Immuntherapie notwendige Zielantigene auf Tumorzellen und auf durch Mikroorganismen infizierten Zellen zu lösen. Da derartige induzierbare Antigene nicht nur auf Tumorzellen vorkommen, sondern generell in Stressituationen produziert werden, können auch Erkrankungen immuntherapeutisch angegangen werden, die durch Infektion von beispielsweise Viren, Einzellern, Bakterien oder Pilzen ausgelöst wurden. Hierbei handelt es sich um die oben bereits näher beschriebenen MIC-Moleküle und Hitzeschock-Proteine.

BEISPIEL 1

Nachdem in präklinischen Tiermodellen die herausragende Wirksamkeit von intakten bsAk nicht nur in vitro, sondern auch in vivo belegt werden konnte (Lindhofer et al., Blood, 88:4651, 1996), wurde die Reinigung von Stammzellpräparaten von kontaminierenden Tumorzellen als weitere Anwendungsmöglichkeit entwickelt (Lindhofer et al., Exp. Hematol. 25:879, 1997).

Auf diesen Versuchen aufbauend, konnte in Folgeversuchen mit kompletten Stammzellpräparaten (ca. 2×10^{10} Zellen), insbesondere die Wirksamkeit im untergesättigten Bereich der Zielantigene nachgewiesen werden. D.h. es wurde, in Titrationsversuchen, so wenig intakter bsAk verabreicht, daß in einem PBSZ (Periphere Blut-Stammzellen)-Präparat mit ca. $6,5 \times 10^9$ T-Zellen, bei einer Gabe von 5µg Antikörper/Präparat, lediglich 3000 CD3 Moleküle von ca. 30.000 CD3 Molekülen/T-Zelle mit dem bsAk gebunden vorlagen (siehe Berechnung). Trotzdem waren die intak-

ten bsAk in der Lage, auch unter diesen Bedingungen, die Zielzellen (hier Tumorzelle: HCT-8) zu zerstören.

Die Versuche waren so aufgebaut, daß von derartig behandelten PBSZ-Präparaten Aliquots entnommen und mit einer definierten Menge von Tumorzellen kontaminiert wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Tumorzellen selbst bei dieser geringen Konzentration von intakten bsAk, bei der nur ein Teil der Zielantigene besetzt vorliegen, zerstört werden.

Die Auswertung des oben beschriebenen Experiments führte zu folgenden Ergebnissen:

Patient WaGr Gesamtzellzahl PBSZ: $2,5 \times 10^{10}$ + 5 µg bsAk

Aliquot 5×10^6 PBSZ + bsAk + Tumorzellen

Platte	kein Antikörper	bsAk anti- CD3Xepcam	Tumorzellen/mononukleäre Zellen (PBSZ)/Loch
24er	6/6*	0/6°	2×10^4 / 2×10^6
96er	12/12	0/12	5000 / 5×10^5
Tumor- reduktion: keine		>5log	Tumorzellanteil: 1% °Σ=1,2x10 ⁵ Tumorz./6- Löcher

* Anzahl der Löcher mit Tumorwachstum, von 6 bzw. 12 plattierten Löchern, nach 14 Tagen Kultivierung.

° Titrationsversuche mit der Tumorzelllinie HCT-8 haben ergeben, daß bereits 1-2 Tumorzellen/Loch ausreichen, um nach 14 Tagen Kultivierung ein deutliches visuell auswertbares Tumorwachstum in 95% aller plattierten Löcher darzustellen.

Berechnung:

Ein intakter bsAk hat ein Molekulargewicht von 150 KDa. D.h. 1 Mol sind 150 Kg und entsprechen definitionsgemäß 6×10^{23} Molekülen. Damit entsprechen 5 µg ca. 2×10^{13} Molekülen.

Nachdem in einem Stammzellpräparat $6,5 \times 10^9$ T-Zellen bestimmt wurden und eine T-Zelle ca. 30.000 CD3 Moleküle trägt, kommt man auf eine Gesamtzahl von $19,5 \times 10^{13}$ CD3 Molekülen im Stamm-

zellpräparat.

Da jeder bsAk einen anti-CD3 Bindungsarm besitzt, kann gefolgert werden, daß theoretisch, setzt man die beiden oben berechneten Molekülmengen in Bezug, in diesem konkreten Beispiel nicht mehr als ca. 3000 CD3 Moleküle von den bsAk besetzt werden können.

L I T E R A T U R

1. Haagen et al., Interaction of human monocyte Fcγ receptors with rat IgG2b, J. Immunolog., 1995, 154: 1852-1860

2. Gast G.C., Haagen I.-A., van Houten A.A., Klein S., Duits A.J., de Weger R.A., Vroom T.M., Clark M.R., J. Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., Bast B.J.E.G. CD8 T-cell activation after intravenous administration of CD3 X CD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma. Cancer Immunol. Immunother. 40: 390, 1995
3. Tenny, C., Jacobs, S., Stoller, R., Earle, M., and Kirkwood, J. Adoptive cellular immunotherapy with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue (ABMR) for recurrent breast cancer (meeting abstract). Proc.Annu.Meet.Am.Soc.Clin.Oncol; 11: A88, 1992 ISSN: 0736-7589. CO: PMAODO - 7589 CO, 1993.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy - 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. Part II Lancet 339: 71-85, 1992
5. Guo et al., Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies. Nature Medicine 3: 451, 1997
6. Lindhofer et al., Preferential species-restricted heavy-light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies, J. Immunology 1995, 155:219

DR. ERNST STURM (1951-1980)
DIPL.-CHEM. DR. HORST REINHARD
DIPL.-ING. UDO SKUHRA
DIPL.-ING. REINHARD WEISE
DIPL.-BIOL. DR. WERNER BEHNISCH
DIPL.-ING. JÜRGEN METZLER*
DIPL.-PHYS. DR. STEPHAN BARTH

FRIEDRICHSTR. 31
D-80801 MÜNCHEN
POSTF. / P.O. BOX 440151
D-80750 MÜNCHEN
* MOHRENSTR. 20
D-96450 COBURG

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

Datum/date

P 10774
Dr.B/La

21. Dezember 1998

Anmelder : Dr. Horst Lindhofer
Bodenseestraße 12
82194 Gröbenzell

Verwendung von Tumorzellen zeitversetzt in Kombination
mit intakten Antikörpern zur Immunisierung

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung autologer Tumorzellen oder allogener Tumorzellen desselben Tumortyps, die je so behandelt wurden, daß ihr Überleben nach Reinfusion verhindert wird, in zeitlich abgestufter Anwendung mit intakten bispezifischen und/oder trispezifischen Antikörpern mit den nachfolgenden Eigenschaften:
 - a) Binden an eine T-Zelle;
 - B) Binden an zumindest ein Antigen auf einer Tumorzelle;
 - γ) Binden durch ihren Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder durch eine dritte Spezifität (bei tri-

spezifischen Antikörpern) an Fc-Rezeptor positiven Zellen,

wobei dem zu immunisierenden Menschen oder dem zu immunisierenden Tier die Tumorzellen und die gegen die Tumorzellen gerichteten intakten Antikörper zeitversetzt verabreicht werden, um eine Immunisierung gegen den Tumor zu erzielen.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen vor den Antikörpern oder die Antikörper vor den Tumorzellen verabreicht werden, wobei der Zeitraum zwischen der jeweiligen Verabreichung 1 - 48 Stunden beträgt.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Zeitraum 1 - 24 Stunden, bevorzugt 1 - 12 Stunden, weiterhin bevorzugt 1 - 6 Stunden oder 1 - 4 Stunden oder 2 - 4 Stunden beträgt.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper in einer Menge, je bezogen auf eine Infusion, von 5 - 500 µg, bevorzugt 10 - 300 µg, weiterhin bevorzugt 10 - 100 µg oder 10 - 50 µg, und die Tumorzellen in einer Menge, bezogen auf eine Infusion, von 10^7 - 10^9 Zellen, bevorzugt ca. 10^8 Zellen, verabreicht werden.
5. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über ihren Fc-Teil bei bispezifischen Antikörpern oder über ihren spezifischen Bindungsarm bei trispezifischen Antikörpern

zur Bindung Fc-Rezeptor positiver Zellen befähigt sind,
die einen Fcγ-Rezeptor I, II oder III aufweisen.

6. Verwendung nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper zur Bindung an Monozyten, Makrophagen,
dendritische Zellen, "Natural Killer"-Zellen (NK-Zellen)
und/oder aktivierte neutrophile Zellen als Fcγ-Rezeptor I
+ III positive Zellen befähigt sind.

7. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper zur Induktion von tumorreaktiven Kom-
plement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion ei-
ner humoralen Immunantwort befähigt sind.

8. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß sie über CD2,
CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28 und/oder CD44 an die T-Zel-
len binden.

9. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden An-
sprüche,
dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß nach ihrer
Bindung an die Fc-Rezeptor positiven Zellen die Expression
von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimula-
torische Antigene und/oder die Sekretion von Zytokinen
durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht
wird.

-
10. Verwendung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Antikörper so ausgewählt werden, daß die Sekretion

von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, INF- γ als Zytokine und/oder von TNF- α erhöht wird.

11. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß der bispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß er ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.

12. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß der bispezifische Antikörper aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotykombinationen ausgewählt wird:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,

Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

Ratte-IgG2b/Human-IgG1,

Ratte-IgG2b/Human-IgG2,

Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],

Ratte-IgG2b/Human-IgG4,

Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

Maus-IgG2a/Human-IgG3[kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit * gekennzeichnet]

Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-
Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-
IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-
IgG3*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Hu-
man- IgG3*[CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge-CH2-CH3]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge-CH2-CH3,
orientaler Allotyp]

Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge-CH2-CH3]

Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-
Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-
IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale
Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG2/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3*[C-terminale Region von CH2 : > AS-Position 251]-Human-IgG3*[CH3]

Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3*-[CH2-CH3]

Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*-[CH3]

HumanIgG1/Ratte[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*[CH3]

HumanIgG1/Maus[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-Human-IgG3*[CH3]

Human-IgG4/Human[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4-[CH2]-HumanIgG3*-[CH3]

13. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der bispezifische Antikörper aus einem heterologen bispezifischen oder trispezifischen Antikörper, bevorzugt einem heterologen Ratte/Maus bispezifischen Antikörper, ausgewählt wird.
 14. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der trispezifische Antikörper einen T-Zell-Bindungsarm, einen Tumorzell-Bindungsarm und eine dritte Spezifität zur Bindung an Fc-Rezeptor positive Zellen besitzt.
 15. Verwendung nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der trispezifische Antikörper so ausgewählt wird, daß er ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD4 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD6 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD8 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.
-

16. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß Tumorzellen eingesetzt werden, die durch Bestrahlung, bevorzugt durch γ -Bestrahlung, weiterhin bevorzugt in einer Dosisstärke von 50 bis 200 Gy, oder durch chemische Substanzen, bevorzugt Mitomycin C, behandelt wurden.
17. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper so ausgewählt ist, daß er an ein Oberflächenantigen als Zielantigen auf der Zielzelle bindet, welches induzierbar ist und im nicht induzierten Zustand (Normalzustand) auf der Zielzelle nicht vorkommt oder in einer derart geringen Zahl, daß die Anzahl für eine Zerstörung der Zielzelle durch den Antikörper nicht ausreicht.
18. Verwendung nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß zur Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen diese vor Verabreichung einer Hitzevorbehandlung unterzogen werden.
19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß als induzierbare Antigene Hitze-Schock-Proteine oder MHC-Klasse-I verwandte MIC-Moleküle eingesetzt werden.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Hitze-Schock-Proteine HSP25-, HSP60- oder HSP70- (HSP72-) oder HSP90-Proteine und als MIC-Moleküle MIC-A- und MIC-B-Moleküle eingesetzt werden.

21. Verwendung nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper gegen solche Zielantigene gerichtet
ist, die nach Induktion auf der Zielzelle in einer Anzahl
von mindestens 100 und höchstens 500.000 pro Zielzelle
vorliegen.
22. Verwendung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper weiterhin so ausgewählt wird, daß er
zur Aktivierung Fc-Rezeptor positiver Zellen befähigt ist,
wodurch die Expression von Cytokinen und/oder co-stimmu-
latorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird.
23. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die zeitlich abgestufte Anwendung der intakten bispe-
zifischen und/oder trispezifischen Antikörper zur Verbes-
serung des Immunisierungserfolges mehrfach erfolgt.

11.11.1999

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung beschreibt die Verwendung von Tumorzellen
~~zeitversetzt in Kombination mit intakten, bevorzugt hete-~~
rologen Antikörpern zur Immunisierung von Mensch und
Tier.

NO. 1199

Abb. 1

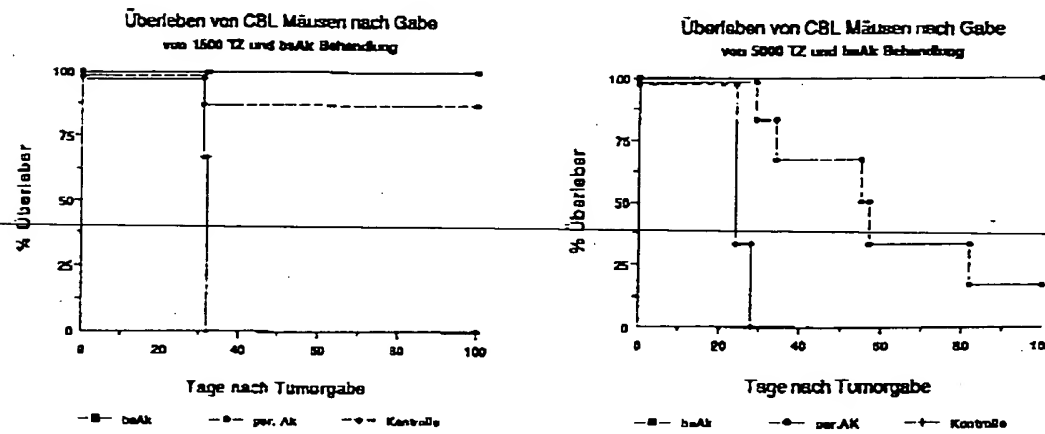


Abb. 2

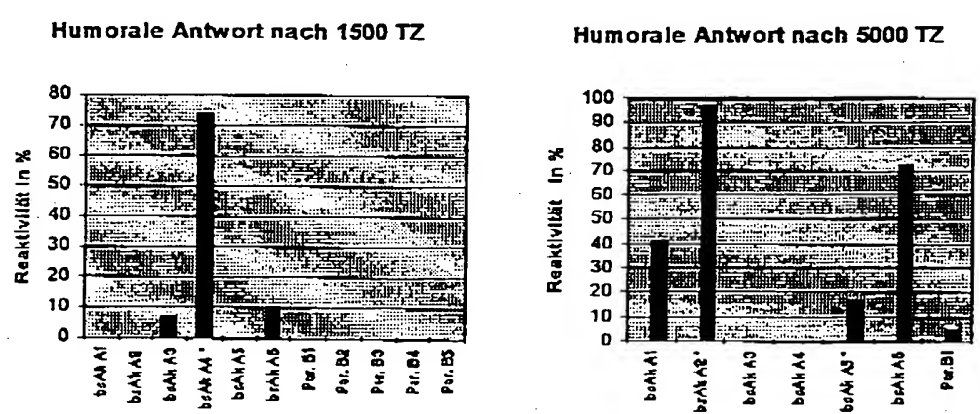


Abb. 3

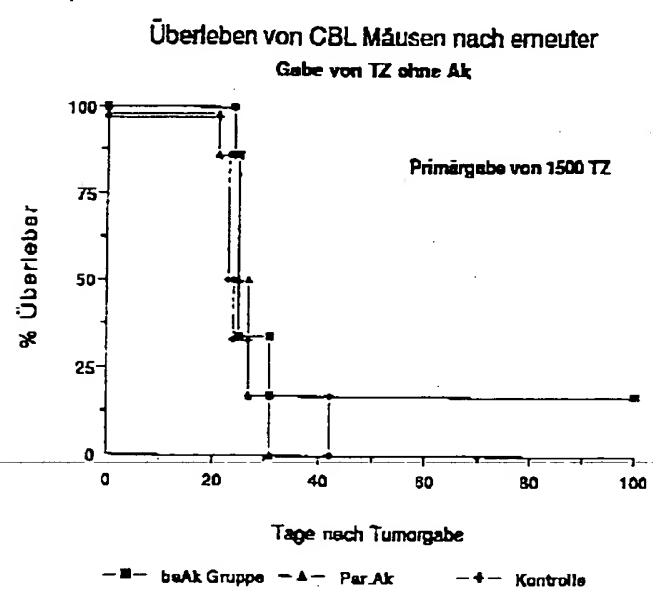


Abb. 3 β

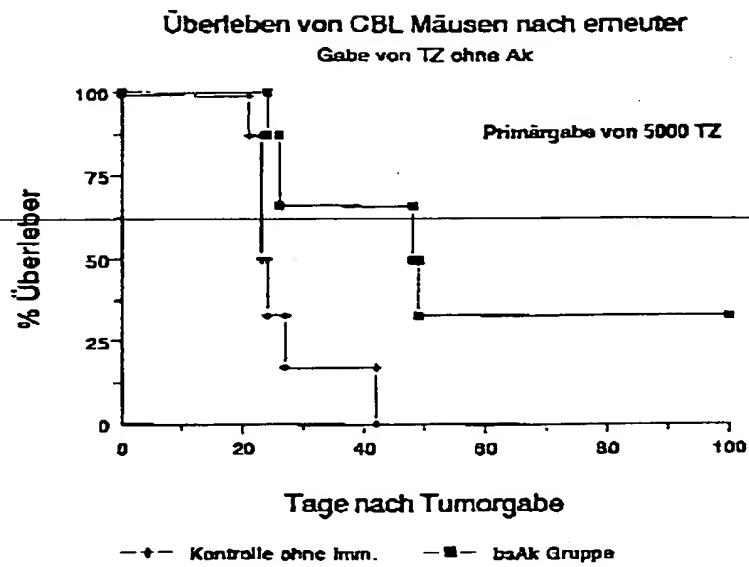


Abb.4
Die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie
mittels bispezifischer Antikörper

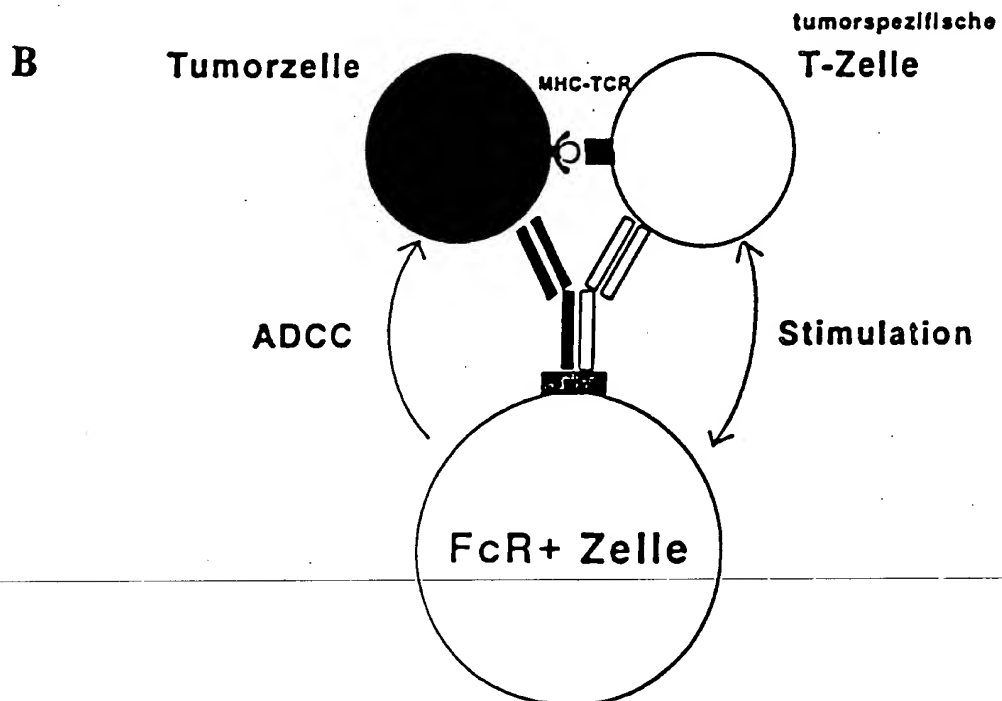
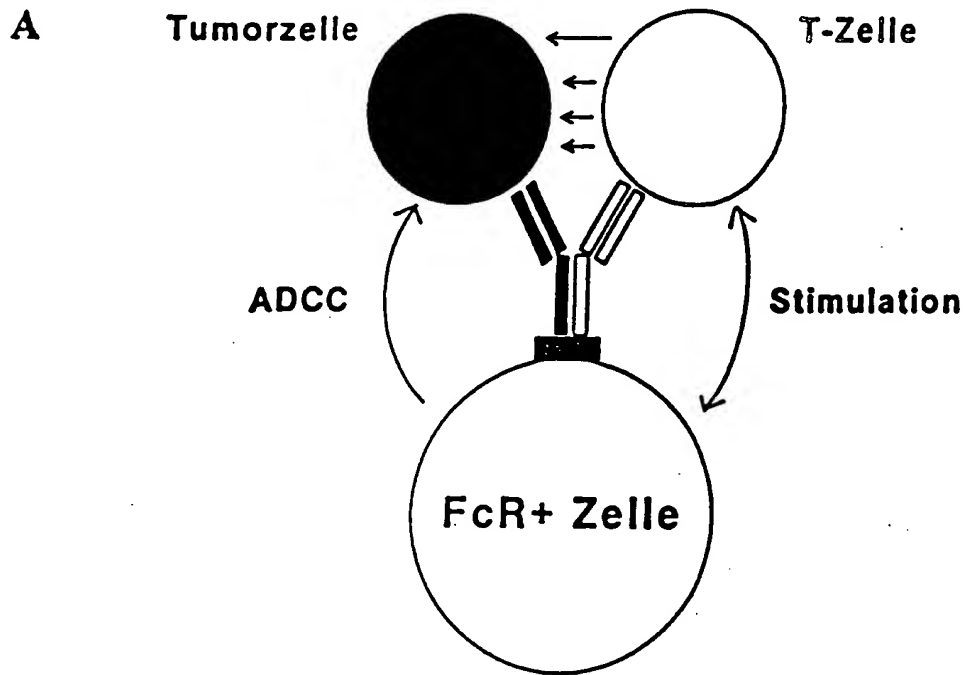


ABBILDUNG 5

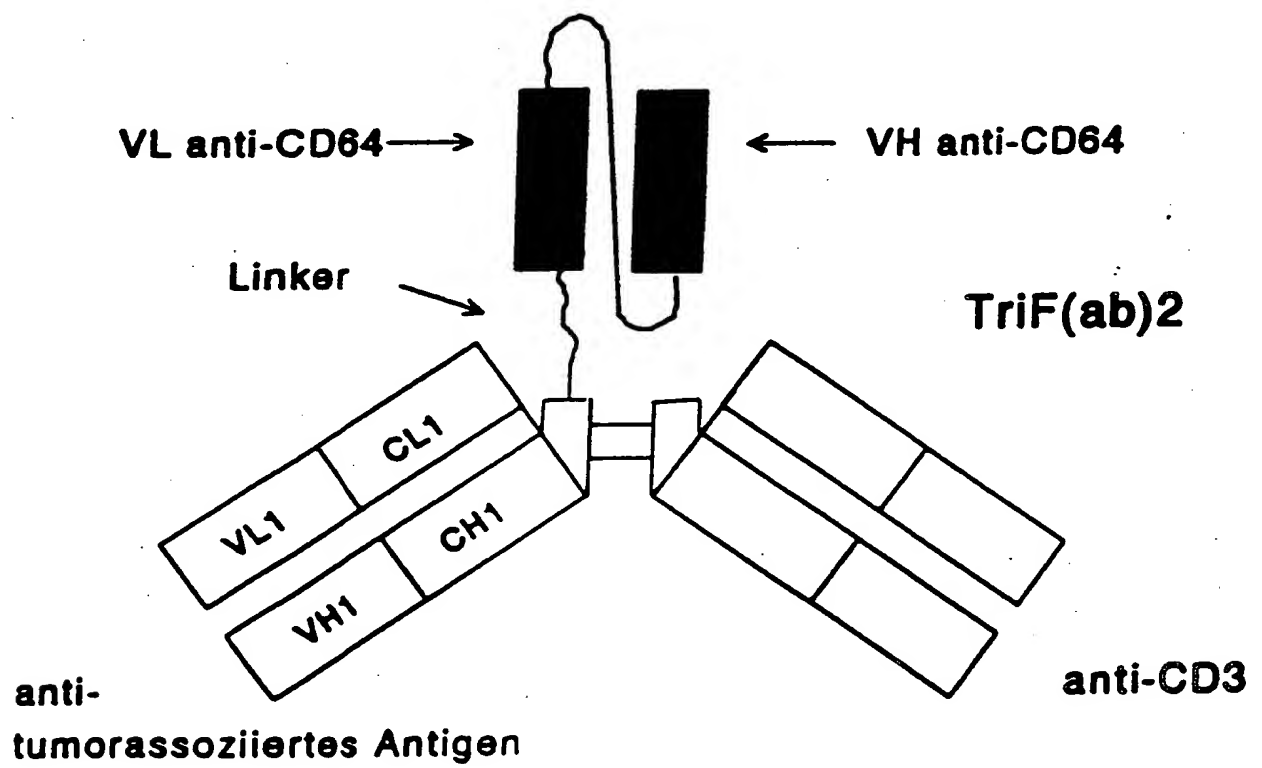


ABBILDUNG 6

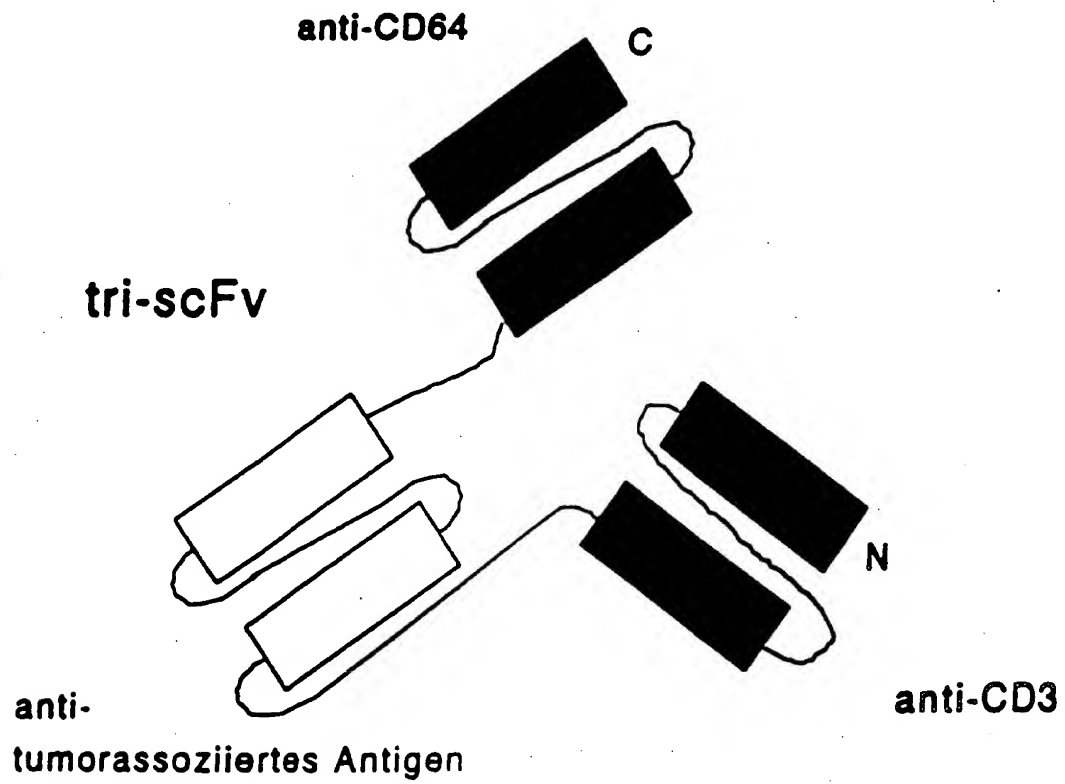
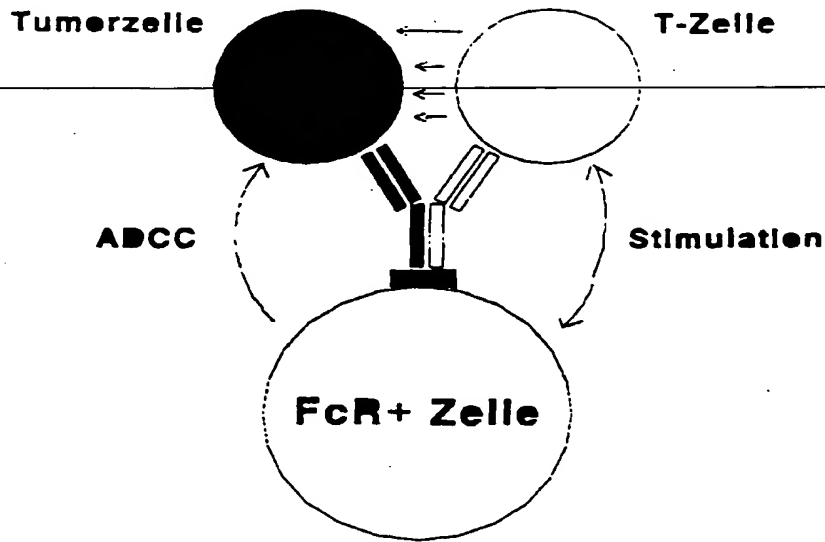
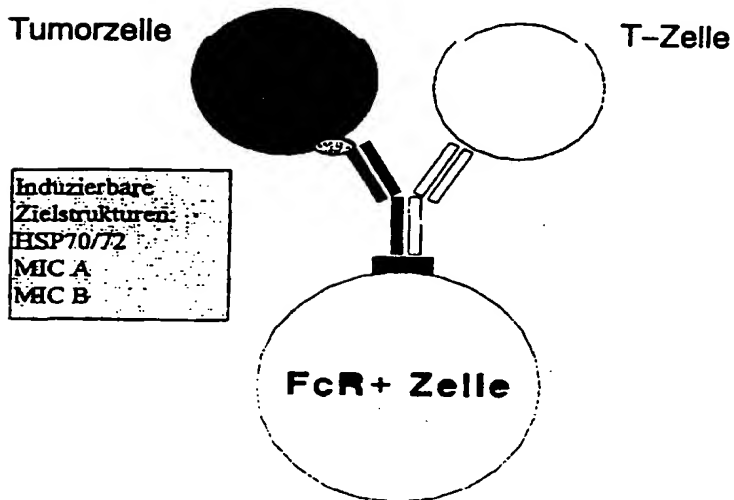


Abb. 7 A + B



A



B

THIS PAGE BLANK (USPTO)
